

Hiraki. 06.10.04

14  
19301JP

PA02-293

reference 2

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-509740

(43) 公表日 平成9年(1997)9月30日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	FI
G01N 27/28	331	0275-2J	G01N 27/28 331A
C12M 1/40		7804-4B	C12M 1/40 B
G01N 27/327		0275-2J	G01N 27/30 353R
27/416		0275-2J	27/46 336Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願平7-521989  
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)2月21日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)8月22日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US95/02157  
 (87) 国際公開番号 WO95/22597  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)8月24日  
 (31) 優先権主張番号 08/200,174  
 (32) 優先日 1994年2月22日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, MX

(71) 出願人 ベーリンガー マンハイム コーポレーション  
 アメリカ合衆国 46250 インディアナ州  
 インディアナポリス, ビー. オー. ボックス 50528, ヘイグ ロード 9115番地  
 (72) 発明者 ディーボルド, エリック アール.  
 アメリカ合衆国 46038 インディアナ州  
 フィッシャーズ, エンスリー ドライブ 12580番地  
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 センサー電極の製造方法

## (57) 【要約】

微量試料の精密な検体濃度測定が可能な電気化学センサーに使用するための、高分解能で、生物分野に適用可能な電極 (11) を製造する方法が開示されている。導電性材料 (3) を第1絶縁基板 (4) に付着する。そして、第2絶縁基板 (5) を導電性材料 (3) に付着し、電極領域 (8) を形成するためにフォトリソグラフィーを使用してパターニングする。別の方法として、対極または照合電極の場合には、電気化学センサー材料 (3) を標準プリント基板 (4) に直接スクリーン印刷することもできる。基板には、剛性を有するもの及び可撓性を有するもののいずれも使用できる。本発明にかかる方法によって製造された電極は、試薬、及び微小で高精度に形成された電極領域 (8、9) を有する電気化学センサーに使用され、微量試料の高精度の電気化学的検体測定が可能となる。

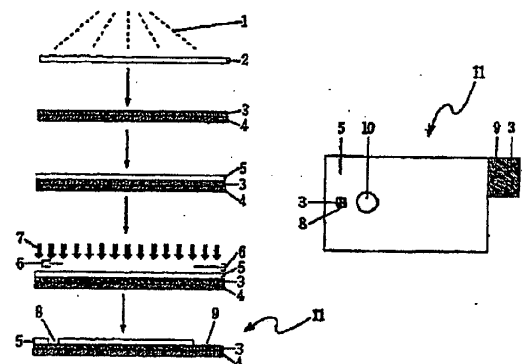


Fig. 1

## 【特許請求の範囲】

1. 流体試料中の検体濃度を測定するのに有用な電気化学センサーであって、

(a) 相対向する作用電極エレメント及び対極エレメントを設け、前記作用電極及び対極のエレメント間に毛管空間を形成する第1切欠部と、前記対極エレメントとメータ及び電源との間の電気接続を可能にする第2切欠部を有するスペーサによって、前記電極が空間的に離間し、前記作用電極エレメント又は対極エレメントにおける一つのポートから前記毛管空間がバント（ガス抜き）され、

前記作用電極エレメントが、

(1) 第1絶縁基板と、

(2) 該第1絶縁基板に付着された導電性材料と、

(3) 該導電性材料と前記スペーサに付着された第2絶縁基板を含み、

該第2絶縁基板は、前記導電性材料の一部を前記毛管空間に露出させるための第1切欠部と、前記導電性材料と前記メータ及び電源との間の接触を可能にする第2切欠部を有し、

前記対極エレメントが、

(1) 絶縁基板と、

(2) 前記絶縁基板及び前記スペーサに付着された導電性材料を含み、

(b) 前記毛管空間に試薬が配置され、該試薬が前記流体試料中の前記検体と特異的に反応し、前記流体試料中の検体濃度と相関関係のある、電気化学的測定が可能な信号を発生させることができる、

ことを特徴とする電気化学センサー。

2. バントポートが前記作用電極エレメント及び前記対極エレメントを貫通することを特徴とする請求項1記載の電気化学センサー。

3. 前記対極エレメントがさらに、

(3) 前記導電性材料と前記スペーサに付着された第2絶縁基板を有し

、該第2絶縁基板が、前記導電性材料の一部を前記毛管空間に露出させるための第

1切欠部と、前記スペーサの前記第2切欠部に重なる第2切欠部を有する、

ことを特徴とする請求項2記載の電気化学センサー。

4. 前記作用電極エレメントの前記導電性材料が貴金属または炭素であることを特徴とする請求項3記載の電気化学センサー。

5. 前記対極エレメントの前記導電性材料が貴金属または炭素であることを特徴とする請求項4記載の電気化学センサー。

6. 前記第2絶縁基板がソルダーレジストであることを特徴とする請求項5記載の電気化学センサー。

7. さらに、

(d) 前記電源が前記作用電極及び対極のエレメントと電気的に接続し、

(e) 前記メータが、前記作用電極及び対極のエレメントと電気的に接続するとともに、電流を測定することができる、

ことを特徴とする請求項6記載の電気化学センサー。

8. 前記試薬がメディエーターと酵素を含むことを特徴とする請求項7記載の電気化学センサー。

9. 前記試薬がさらに、緩衝剤、膜形成剤及び界面活性剤を含むことを特徴とする請求項8記載の電気化学センサー。

10. 前記メディエーターが $[Os(II)(bpy)_2(im)Cl]^+[Cl]^-$ であって、前記酵素がグルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項8記載の電気化学センサー。

11. 前記検体がグルコースであり、前記メディエーターが $[Os(II)(bpy)_2(im)Cl]^+[Cl]^-$ であり、前記酵素がグルコースオキシダーゼであり、

前記緩衝剤がMES緩衝剤であり、前記膜形成剤がポリビニルアルコールであり、前記界面活性剤が非イオン界面活性剤であることを特徴とする請求項9記載の電気化学センサー。

12. 流体試料中の検体濃度を測定するのに有用な電気化学センサーであって、

(a) 相対向する作用電極エレメント及び照合電極エレメントを設け、前記作用電極及び照合電極のエレメント間に毛管空間を形成する第1切欠部と、前記照合電極エレメントとメータ及び電源との間の電気的接続部とを有する。

有するスペーサによって、前記電極が空間的に離間し、前記作用電極エレメント又は照合電極エレメントにおける一つのポートから前記毛管空間がベントされ、前記作用電極エレメントが、

(1) 第1絶縁基板と、

(2) 該第1絶縁基板に付着された導電性材料と、

(3) 該導電性材料と前記スペーサに付着された第2絶縁基板を含み、

該第2絶縁基板は、前記導電性材料の一部を前記毛管空間に露出させるための第1切欠部と、前記導電性材料と前記メータ及び電源との間の接触を可能にする前記第2切欠部を有し、

前記照合電極エレメントが、

(1) 絶縁基板と、

(2) 前記絶縁基板及び前記スペーサに付着された導電性照合物質を含み、

(b) 前記毛管空間に試薬が配置され、該試薬が前記流体試料中の前記検体と特異的に反応し、前記流体試料中の検体濃度と相関関係のある、電気化学的測定が可能な信号を発生させることができる、ことを特徴とする電気化学センサー。

13. ベントポートが前記作用電極エレメント及び前記照合電極エレメントを貫通することを特徴とする請求項12記載の電気化学センサー。

14. 前記照合電極エレメントがさらに、

(4) 前記照合電極材料と前記スペーサに付着された第2絶縁基板を含み、該第2絶縁基板が、前記導電性材料の一部を前記毛管空間に露出させるための第1切欠部と、前記スペーサの前記第2切欠部に重なる第2切欠部を有する、ことを特徴とする請求項13記載の電気化学センサー。

15. 前記作用電極エレメントの前記導電性材料が貴金属または炭素であることを特徴とする請求項14記載の電気化学センサー。

16. 前記照合電極エレメントの前記導電性照合材料が銀/塩化銀であることを特徴とする請求項15記載の電気化学センサー。

17. 前記第2絶縁基板がソルダーレジストであることを特徴とする請求項16記載の電気化学センサー。

18. さらに、

(d) 前記電源が前記作用電極及び照合電極のエレメントと電気的に接続し、

(e) 前記メータが前記作用電極及び照合電極のエレメントと電気的に接続するとともに、電流を測定することができる、

ことを特徴とする請求項17記載の電気化学センサー。

19. 前記試薬が酸化還元メディエーターと酵素を含むことを特徴とする請求項18記載の電気化学センサー。

20. 前記試薬がさらに、緩衝剤、膜形成剤及び界面活性剤を含むことを特徴とする請求項19記載の電気化学センサー。

21. 前記酸化還元メディエーターが $[Os(II)(bpy)_2(im)Cl]^+$

$[Cl]^-$ であって、前記酵素がグルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項19記載の電気化学センサー。

22. 前記検体がグルコースであり、前記酸化還元メディエーターが $[Os(II)(bpy)_2(im)Cl]^+[Cl]^-$ であり、前記酵素がグルコースオキシダーゼであり、前記緩衝剤がMES緩衝剤であり、前記膜形成剤がポリビニルアルコールであり、前記界面活性剤が非イオン界面活性剤であることを特徴とする請求項20記載の電気化学センサー。

23. 流体試料中の検体濃度を測定するのに有用な電気化学センサーであって、

(a) 第1絶縁基板と、

(b) 作用電極及び対極（該電極は第1と第2の端部及び中間部を有し、所定のパターンで前記第1絶縁基板に付着され、該パターンはフォトリソグラフィー及び化学エッチングの組み合わせによって規定される）と、

(c) 前記作用電極及び対極の前記中間部に重なる第2絶縁基板と、

(d) 少なくとも前記作用電極の前記第1端部に配置された試薬（該試薬は前記流体試料中の前記検体と特異的に反応し、前記流体試料中の検体濃度と相関関係のある、電気化学的測定が可能か検体を検出する）と、

を含むことを特徴とする電気化学センサー。

24. 前記作用電極エレメントの前記導電性材料が貴金属であることを特徴とする請求項23記載の電気化学センサー。

25. 前記対極エレメントの前記導電性材料が貴金属であることを特徴とする請求項24記載の電気化学センサー。

26. さらに、

(d) 前記作用電極及び対極の前記第2端部と電気的に接続する電源と、

(e) 前記作用電極及び対極の前記第2端部と電気的に接続するとともに、電流

を測定することができるメータと、

を含むことを特徴とする請求項25記載の電気化学センサー。

27. 前記試薬がメディエーターと酵素を含むことを特徴とする請求項26記載の電気化学センサー。

28. 前記試薬がさらに、緩衝剤、膜形成剤及び界面活性剤を含むことを特徴とする請求項27記載の電気化学センサー。

29. 前記メディエーターが $[Os(II)(bpy)_2(im)Cl]^+[Cl]^-$ であって、前記酵素がグルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項27記載の電気化学センサー。

30. 前記検体がグルコースであり、前記メディエーターが $[Os(II)(bpy)_2(im)Cl]^+[Cl]^-$ であり、前記酵素がグルコースオキシダーゼであり、前記緩衝剤がMES緩衝剤であり、前記膜形成剤がポリビニルアルコールであり、前記界面活性剤が非イオン界面活性剤であることを特徴とする請求項28記載の電気化学センサー。

31. 電気化学センサーに使用する電極エレメントの製造方法であって、

(a) 第1絶縁基板に導電性材料を付着し、

(b) 前記導電性材料を第2絶縁基板で被覆し、該第2絶縁基板は、紫外線を照射した後は現像液に不溶性となり、

(c) 前記第2絶縁基板にフォトリソを介して紫外線を照射して、該第2絶縁基板の一部を前記現像液に不溶性となし、

( d ) 前記第 2 絶縁基板を前記現像液にさらすことにより、前記第 2 絶縁基板の可溶性部分を除去するとともに、第 1 及び第 2 切欠部を露出させ、前記第 1 切欠部を電極領域として作用させ、前記第 2 切欠部を前記導電性材料とメタ及び電源との間の接触パッドとして作用させる、

ことを特徴とする電極エレメントの製造方法、

32. 前記導電性材料が貴金属または炭素であることを特徴とする請求項 31 記載の方法、

33. 前記第 2 絶縁基板がソルダーレジストであることを特徴とする請求項 32 記載の方法、

34. 前記導電性材料が真空スパッタリングまたは蒸着によって前記第 1 絶縁基板に溶着されることを特徴とする請求項 33 記載の方法、

35. 前記導電性材料が無電解メッキまたは電気メッキによって前記第 1 絶縁基板に溶着されることを特徴とする請求項 33 記載の方法、

36. 前記導電性材料が貴金属または炭素であって、前記第 1 絶縁基板に溶着される前に、薄い支持材料に付着されることを特徴とする請求項 31 記載の方法、

37. 前記薄い支持材料がポリイミド、ポリエステル、ポリエチレンテレフタレート (PET)、またはポリカーボネートであることを特徴とする請求項 36 記載の方法、

38. 前記導電性材料が銀であって、前記電極領域が塩化銀で被覆されていることを特徴とする請求項 31 記載の方法、

39. 前記第 2 絶縁基板がソルダーレジストであることを特徴とする請求項 38 記載の方法、

40. 前記導電性材料が真空スパッタリングまたは蒸着によって前記第 1 絶縁基板に溶着されることを特徴とする請求項 39 記載の方法、

41. 前記導電性材料が無電解メッキまたは電気メッキによって前記第 1 絶縁基板に溶着されることを特徴とする請求項 39 記載の方法、

42. 前記導電性材料が銀であって、前記第 1 絶縁基板に溶着されることを特徴とする請求項 39 記載の方法、

支持材料に付着されることを特徴とする請求項31記載の方法。

43. 前記薄い支持材料がポリイミド、ポリエステル、ポリエチレンテレフタレート (PET)、またはポリカーボネートであることを特徴とする請求項42記載の方法。

44. 電気化学センサーに使用する対極エレメントの製造方法であって、

(a) 第1基板に導電性材料を付着し、該第1基板は銅層とガラス繊維層を含み、該銅層は前記導電性材料と前記ガラス繊維層との間に位置し、

(b) 前記導電性材料にスペーサを装着し、該スペーサは、電極領域を規定する第1切欠部と、前記導電性材料とメータ及び電源との接触を可能にする第2切欠部を有する、

ことを特徴とする電極エレメントの製造方法。

45. 前記導電性材料がスクリーン印刷によって前記第1基板の銅層に付着されることを特徴とする請求項44記載の方法。

46. 前記導電性材料が貴金属または炭素であることを特徴とする請求項45記載の方法。

47. 前記導電性材料が銀であって、塩化銀で被覆され、これによって照合電極を形成することを特徴とする請求項45記載の方法。

48. 前記導電性材料が前記第1基板の前記銅層に積層により付着されることを

特徴とする請求項44記載の方法。

49. 電気化学センサーに使用する電極エレメントの製造方法であって、

(a) 第1絶縁基板に第1導電性材料を付着し、

(b) 該第1導電性材料に第2導電性材料を付着し、

(c) 該第2導電性材料にスペーサを装着し、該スペーサは、電極領域を規定する第1切欠部と、前記導電性材料とメータ及び電源とを接触させる第2切欠部を有する、

ことを特徴とする電極エレメントの製造方法。

50. 前記第1導電性材料がパラジウムであることを特徴とする請求項49記載の方法。



51. 前記第1導電性材料が薄い支持材料に付着され、該薄い支持材料が前記第1絶縁基板に付着されることを特徴とする請求項50記載の方法。
52. 前記第2導電性材料が銀であることを特徴とする請求項51記載の方法。
53. 前記第1導電性材料が真空スパッタリングまたは蒸着によって前記薄い支持材料に溶着されることを特徴とする請求項52記載の方法。
54. 前記第1導電性材料が無電解メッキまたは電気メッキによって前記薄い支持材料に溶着されることを特徴とする請求項53記載の方法。
55. さらに、
- (e) 前記スパーサの前記第1切欠部によって露出された前記銀に $\text{FeCl}_3$ を分配し、これによって塩化銀層を形成する、
- ことを特徴とする請求項54記載の方法。
56. 電気化学センサーに使用する電極エレメントの製造方法であって、
- (a) 薄い支持材料に導電性材料を付着し、
- (b) 該薄い支持材料を第1絶縁基板に付着し、
- (c) 前記導電性材料を光活性エッチレジストで被覆し、
- (d) 該光活性エッチレジストに、フォトリソマスクを介して紫外線を照射し、紫外線を照射した前記光活性エッチレジストの一部を現像液に不溶性となし、
- (e) 紫外線を照射した後、前記光活性エッチレジストを現像液にさらし、これによって、前記光活性エッチレジストの部分を除去して前記導電性材料を露出させ、
- (f) 現像液にさらした後、前記光活性エッチレジスト及び前記導電性材料を化学エッチング剤にさらし、これによって、前記導電性材料の、前記光活性エッチレジストによって被覆されていない部分を除去し、
- (g) 前記光活性エッチレジストの残りを除去し、これによって、前記第1絶縁基板上に導電性材料の電極パターンを露出させる、
- ことを特徴とする電極エレメントの製造方法。
57. 前記導電性材料の電極パターンが作用電極及び対極を含むことを特徴とする請求項56記載の方法。

58. 前記導電性材料が貴金属であることを特徴とする請求項57記載の方法。

59. 前記薄い支持材料がポリイミド、ポリエステル、ポリエチレンテレフタレート (PET)、またはポリカーボネートであることを特徴とする請求項58記載の方法。

60. 前記導電性材料が真空スパッタリングまたは蒸着によって前記薄い支持材料に溶着されることを特徴とする請求項59記載の方法。

61. 前記導電性材料が無電解メッキまたは電気メッキによって前記薄い支持材

料に溶着されることを特徴とする請求項59記載の方法。

62. さらに、

(g) 前記対極の表面に銀を溶着し、該銀を $\text{FeCl}_3$ で処理することにより、

前記対極を銀/塩化銀照合電極に変換する、

ことを特徴とする請求項57記載の方法。

## センサー電極の製造方法

本発明は、電気化学センサー及び電気化学センサーに使用する電極の製造方法に関するものである。

医療分野における血液中の検体の種々の検査や、環境分野における水質汚染または土壌汚染の監視のためにセンサーが使用されていることは良く知られている。これら種々のセンサーによって、試薬や試料に接触させた2以上の電極間に電位差を与えて電気化学的な測定がなされている。2つの電極を有するセンサーは公知であって、作用電極と、対極または照合電極／対極（「照合電極」）で構成される。3つの電極を有するセンサーについては、作用電極と、対極と、照合電極とで構成される。上記すべてのセンサーの設計において、作用電極の面積は、直接測定電流の量に影響を与えるため、作用電極の面積の製造誤差の極力小さいセンサーを製造することが熱望されている。

センサーに使用する電極の製造は、切削、被覆、「厚膜付着法」または「スクリーン印刷」、及び「薄膜付着法」（集積回路の製造における方法と同様のもの）によって行われる。最近、電極を基板の表面にパターニングするため、フォトリソグラフィもまた使用されている。これらの技術によって、電極の寸法を精密に決定し、支持基板に置くことが可能となっているが、このような電極を有し、精密な測定に使用されるセンサーの能力は、作用電極の面積の精度によって制限を受ける。

プリント回路基板（以下「PCB」と略称する。）及び可撓性回路は、電気部品を接続する手段として電子工業界において広く使用されている。そして、PCB及び可撓性回路を製造するために2つの基本システムが使用されている。一つ

は加算法であり、もう一つは減算法である。加算法では、絶縁性プラスチック、セラミックまたは他の基板等の最上部に所望の回路パターンが構築される。また、減算法においては、絶縁基板（PCBの場合には、ガラスエポキシ）の最上

、可撓性回路の場合にはポリイミド等)が銅箔とともに層状に重ねられる。銅箔は、その後、標準的なフォトリソグラフィー及び湿式化学エッチング技術を使用してパターニングされる。銅回路は、その後、ニッケル、金その他の金属でメッキされる。

しかし、PCB工業において周知の上記金属パターン技術は、生物学の分野(検体検知等)には適していない。上述のように、銅被覆基板上への金属メッキによって、表面が不規則かつ粗くなるため、生物流体が下層の銅に浸透し、測定に障害を与えるバックグラウンドの電気化学的信号が増加することになる。さらに、センサーに広く使用される銅及びニッケルはそれら自身、電位的に、電気的に活性であるため、作用電極として使用することはできない。

#### 発明の要約

本発明は、PCB工業において広く使用されているいくつかの技術に新規な技術を適用することにより、電気化学センサーに使用される高分解能電極を提供することを目的とする。本発明にかかる方法によって製造された電極は、精密で複製可能な大きさ及び形状を有し、また、精密な作用電極の面積を有していることが重要である。これらの電極が電気化学センサーに使用された場合、試料が非常に小さくても、高精度の電気化学的測定が可能となる。(血液試料の検体の測定にセンサーを使用した場合の)本発明の顕著な利点としては、電気化学的測定に使用する血液量が少なく済み、これによって、少量の試料を採取するための非常に痛みの少ないランセット装置を用いることができる点がある。一態様として上記電極を基板材とは別部品として製造することも可能であるため、2つの電極の製造工程を分けることができる点も本発明の利点である。これによって、作用電極及び対極に関連する薬品を分けることができる。

本発明にかかる電極製造方法では、最初に、(銅箔層ではなく)裸の硬質のま

たは可撓性の基板に高品質の金属薄膜を形成する。そして、電極領域と接触パッドを精密に形成するため、フォトリソグラフィーを使用して、フォトレジストの一つの層に薄い金属層を形成してパターニングする。重要なのは、パターニング後、フォトレジスト層を除去しないことであり、このフォトレジスト層が完成し

た電気化学センサーの絶縁体として機能することである。もう一つの方法として、電気絶縁材料を金属層に直接、パターンとしてスクリーン印刷し、これによって電極領域と、接触パッドを構成する方法がある。照合電極または対極の場合には、金属が標準PCB基板に直接適用される。

そして、上記電極は、新規な電気化学センサーの製造に使用することができ、このセンサーにおいて、電極は相対向するように、または、隣接するように配置される。1または2の露出した電極面に試薬が触れると、試料中の検体の電気化学的検知または測定がなされる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明にかかる作用電極、対極または照合電極のエレメントの製造方法の一実施例を示す図である。

図2は、本発明にかかる作用電極、対極または照合電極のエレメントの製造方法の他の実施例を示す図である。

図3は、本発明にかかる照合電極または対極のエレメントの製造方法の一実施例を示す図である。

図4は、本発明にかかる照合電極または対極のエレメントの製造方法の他の実施例を示す図である。

図5は、本発明にかかる対向電極電気化学センサーの分解図である。

図6は、図5の対向電極電気化学センサーの組立図である。

図7a乃至図7hは、本発明にかかる隣接電極電気化学センサーに使用する隣接する電極エレメントの製造方法を示す図である。

図8aは、図7gの電極エレメントの上面図であって、図8bは図7hの電極エレメントの上面図である。

図9は、本発明にかかる電気化学センサーの一実施例の用量作用を示す図である。

#### 発明の詳細な説明

生物液体において、電極を機能的にするために、あるPCBの製造技術を適用するには、測定に関連する電位範囲における電気化学的不活性にして、

きく、この電位の範囲は、銀/塩化銀 ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) において約  $-1 \sim +1$  ボルトの範囲である。本発明では、電極として、銅箔層ではなく、高品質の貴金属薄膜が使用される。これらの薄い金属箔は、適当な箔状物質 (例えば、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリイミド等) にスパッタリングまたは蒸着により形成することができ、その後、支持基板 (例えば、カリフォルニア州、カナガバークの Courtaulds Performance Films 社製造のもの) に積層される。あるいは、その金属薄膜を支持基板に直接付着することができる。その結果得られた金属基板は、非常に小さく、均一な粒径のものが得られ (直径  $10 \text{ nm}$  (ナノメートル) 乃至  $50 \text{ nm}$ )、さらに重要な点として、銅等の電気化学的に活性な物質を含んでいない。上記のようにして得られた表面は、生物溶液あるいは浸食性溶液の中で電気化学的測定をするにあたってほとんど理想に近いものである。第2絶縁基板が金属層に積層されるとともに、精密にパターニングされ、開放電極領域及びメータ接触パッドが形成される。第1絶縁基板、金属及び第2絶縁基板の組み合わせを、本明細書において、「電極エレメント」と呼ぶことにする。

以下に2種類の電極エレメントを示す。対向電極エレメントは、第2の対向電極エレメントと組み合わせて使用するよう設計される。両電極エレメントは、「サンドイッチ」状にスペーサによって分離される。本実施例のものは、「対向電極電気化学センサー」と呼ばれる。この対向電極電気化学センサーには、以下に示すように、作用電極エレメント並びに対極エレメント若しくは照合電極エレメントのいずれかが含まれる。「隣接」電極エレメントは、同じ基板上に平行状に並んで製造される。この実施例におけるセンサーは、「隣接電極電気化学センサー」と呼ばれる。この隣接電極電気化学センサーには、作用電極エレメント並

びに対極若しくは照合電極のエレメントのいずれか、あるいは、作用電極、対極及び照合電極エレメントが含まれる。

#### 対向電極電気化学センサーの対向電極エレメントの製造

図1に示す本発明にかかるセンサー電極の製造方法によって、作用電極、対極または照合電極エレメントを製造する。導電性材料1 (例えば、貴金属、炭素等) を、薄い支持材料2 (例えば、ポリイミド、またはポリエステル、ポリエチレ

ンテフタレート (PET) 等の他のポリマー、またはポリカーボネート等) 上に真空スパッタリングまたは蒸着し、金属被覆薄型支持基板 3 (例えば、カリフォルニア州、カナガパークの Courtaulds Performance Films 社製造のもの) を形成する。この工程は、同じ手段による、クロム、チタンその他の適当な材料 (図 1 には示さず) の薄い基層の付着の前又は後に行うことができる。薄い基層を形成する目的は、導電性材料 1 と薄い支持材料 2 との接着性を増加させるためだけでなく、導電性材料 1 の微細構造を安定させるためである。

上記工程を行う代わりに、無電解メッキ法、または活性化と電気メッキの組み合わせによって、導電性材料 1 を薄い支持材料 2 の表面に付着させることも可能である。これらの工程は周知であるが、以下に簡単に説明する。電気メッキでは、薄い支持材料 2 を洗浄し、必要であれば、その表面を粗くする工程を付加する。次に、薄い支持材料 2 の表面を化学処理、すなわち、コロイド触媒 (例えば、 $PdCl_2-SnCl_2$  ヒドロソル) によって活性化する。このコロイド触媒は薄い支持材料 2 の表面に強力に吸収される。基板と吸収された触媒を、次に「加速槽」において処理する。これは、 $PdCl_2$  を含有する酸浴槽を使用した無電解メッキ法として周知の技術である。最終的に、薄い支持材料 2 には、無電解メッキ浴槽においてメッキし、薄い支持材料 2 の表面に導電性材料 1 の薄い層を付着する。

電気メッキにより、商業化されている表面処理方法 (例えば、Solution Technology Systems 社による方法がある) によって、薄い支持材料 2 を最初に活性化する。そして、電気メッキ工業において周知の方法により、薄い支持材料 2 に、導

電性材料 1 を電気メッキし、金属被覆薄型支持基板 3 を形成する。

金属被覆薄型支持基板 3 は、適当な積層接着システム (例えば、カリフォルニア州、カナガパークの Courtaulds Performance Films 社の Z-FLEX (登録商標) 接着システム等) を使用して、(例えば、ミネソタ州、リッチフィールドのリッチフィールドプレジジョンコンポーネンツ社の方法によって) 第 1 絶縁基板 4 (例えば、ウィスコンシン州、ラクロッセの Norplex/Oak 社製の 10 ミル (0

... 10 ミル (0.1 ミリ) のガラス

繊維回路基板等)に積層する。

第1絶縁基板4としては、適当な非導電性ガラスや、所望の支持剛性を有するプラスチック材料であればいかなるものでも使用できる。この工程において、金属被覆薄型支持基板3及び第1絶縁基板4はホットプレスを使用して積層することも可能である。

一旦金属被覆薄型支持基板3が第1絶縁基板4に支持されると、金属被覆薄型支持基板3は適当なはんだレジストを使用して処理され、メータ及び電源に挿入される電極領域及び接触パッド領域が形成される。金属被覆薄型支持基板3の表面は、適当な溶媒システム(例えば、クロロフルオロカーボン溶媒等)によって洗浄した後、市販のソルダーレジストである第2絶縁基板5によって、スクリーン印刷または流し塗りによって被覆し、製造業者の明細書に示す要領で乾燥する。使用することができる市販のソルダーレジストの例としては、Enthone - OM 1社製の登録商標ENPLATE、DSR-3242のソルダーレジスト(ネガ型レジスト)がある。第2絶縁基板5には、フォトマスク6を介して紫外線7を照射する。その結果、第2絶縁基板5に潜像が発生し、紫外線7が照射された領域は現像液に不溶解となる。現像の前に、フォトマスク6を除去する。使用すべき現像液の種類は工程に応じて決定されるが、一般的には、そのレジストの製造業者によって特定される。現像液による処理工程において第2絶縁基板5の一部が除去され、第1切欠部8及び第2切欠部9が形成される。この手順に従えば、残った第2絶縁基板5は熱と紫外線の適当な組み合わせによって永久的に硬化され、生物流体に浸された場合の良好な障壁を形成することができる。上記ネガ型ソルダーレジストに加えて、本発明ではポジ型レジストを使用することも可能で

ある。ポジ型ソルダーレジストの場合には、レジストが、製造業者によって特定される電磁放射に曝されなければ、使用されたレジストは現像液に不溶解である。

上記フォトリソグラフィ工程の結果、第1切欠部8及び第2切欠部9が第2絶縁基板5に形成され、下層の金属被覆薄型支持基板3を露出させる。完成した電極エレメント11において、第1切欠部8の領域が電極領域を形成し、第2切



欠部9が、電極エレメント11とメータ及び電源との間の接触パッドとして機能する。電極エレメント11が照合電極エレメントの場合には、照合電極材料（例えば、ミシガン州ポートフロンズのAcheson Colloids社製の#DB2268、銀／塩化銀インク）が第1切欠部8によって形成される電極領域に追加して添加される。

重要なのは、フォトリソグラフィーを使用してレジスト層を除去することは周知であるが、本発明においては、第2絶縁基板5が除去されず、完成した電気化学センサーにおいて絶縁基板として機能することである。さらに、ベントポート10、これは第2絶縁基板5、金属被覆薄型支持基板3及び第1絶縁基板4を貫通しているが、完成した電気化学センサーにおいて毛管空間（以下に示す）のベントポートとして及び／又は試料を毛管空間に導入する手段として含まれ、使用される。この段階では、後述する適当な電極領域に、必要ないかなる試薬をも塗布することができる。

上述のように、第2絶縁基板を使用し、作用電極領域及び接触パッドを形成するフォトリソグラフィーを行う代わりに、薄膜絶縁材料を金属被覆薄型支持基板3にスクリーン印刷することもできる。この薄膜絶縁材料は、（例えば、Acheson Colloids社製の#ML-25198またはDuPont Electronics社製#5018）によって紫外線硬化させることができるとともに、（例えば、Melech社製#7192）によって熱硬化させることができる。薄膜絶縁材料は、特定のパターンのスクリーンを介して適用することができ、薄膜絶縁材料に第1切欠部8及び第2切欠部9を形成することができる。これによって、下層の金属被覆薄型支持基板3が露出する。完成した電極エレメントでは、第1切欠部8の領域は電極領域を形成し、第2切欠部9は電極エレメントとメータ及び電源間の接触パッドとし

て機能する。薄膜絶縁材料は、金属被覆薄型支持基板を適用した後、光化学的に架橋結合するものを選択することができる。これによって金属被覆薄型支持材料の表面への安定性及び付着性が増加するだけでなく、不透過障壁層が形成され、生物媒体に使用することが可能となる。薄型支持材料もまた、完成した電気化学

、完成した電気化学センサーに試料を導入する手段に含まれ、そのように使用される。

作用電極、対極、照合電極エレメントを製造するのに使用する、本発明にかか  
るもう一つの方法を図 2 に示す。本実施例では、導電性材料を、より可撓性の  
大きい第 1 絶縁基板に直接付着する。これによって、電極エレメントをより安価に  
製造することができるとともに、ほぼ連続生産に近い製造方法が得られる。導電  
性材料 1 2 を真空スパッタリングまたは蒸着によって直接第 1 絶縁基板 1 3 (例  
えば、カリフォルニア州、カナガパークの Courlauds Performance Films 社製造  
のもの) 上に付着する。適当な基板の例としては、MYLAR (登録商標) 基板  
(デュボン社製) があり、約 10 ミル (0.254 mm) の厚さを有する。その  
他の適当なプラスチック、ガラス、ガラス繊維製の基板も使用可能である。第  
1 絶縁基板 1 3 上に導電性材料 1 2 を付着するためには、上記の方法に代わりに  
、上述の無電解メッキ法または電気メッキ技術を使用することもできる。

そして、導電性材料 1 2 を、静止したロール形状のまま流し塗りまたは漬け塗  
り液体ネガ性ソルダーレジスト (例えば、チバガイギ製のソルダーレジスト PR  
OBOMER (登録商標)) 等の第 2 絶縁基板 1 4 で被覆し、適当な赤外線と加  
熱との組み合わせによって乾燥する。第 2 絶縁基板 1 4 には、フォトマスク 1 5  
を介して紫外線 1 6 が照射される。上記のように、第 2 絶縁基板 1 4 には潜像が  
現れたら、引き続いてフォトマスク 1 5 を除去し、現像液で処理し、第 2 絶縁基  
板 1 4 の一部分を取り除き、第 1 切欠部 1 7 及び第 2 切欠部 1 8 を形成する。(  
第 2 絶縁基板 1 4 を使用する代わりに、上述の露光工程を介して得られるものに  
相当する特定のパターンの非導電性インク層をスクリーン印刷することも可能で  
ある。) 上述のとおり、第 2 絶縁基板 1 4 もまた、永久的に硬化させることが可  
能である。さらに、本発明においては、前述のもの以外のソルダーレジスト (例  
えばポジ型レジスト) を使用することも可能である。

完成した電極エレメント 20 において、第 1 切欠部 1 7 の領域は電極領域を形  
成し、第 2 切欠部 1 8 は電極 20 とメータ及び電極との間の接触パッドとして機  
能する。上述のように、電極 20 が照合電極エレメントの場合には、照合電極材

料（例えば、ミシガン州ポートフロンズのAcheson Colloids社製の#DB2268、銀／塩化銀インク）が、第1切欠部17によって形成される電極領域に追加して使用される。

可撓性第1絶縁基板を利用する上記電極エレメントの製造方法では、連続生産が可能となり、金属がロール状の第1絶縁基板に付着される。金属層を形成したプラスチックロールは、その後、第2絶縁基板によって被覆し、ロールに沿って第2絶縁基板に、連続露光装置を介して、一連の所望のパターン（電極領域及び接触パッド）を露光処理する。その後、製造業者の明細書に従って、当業者にとって周知の要領で現像処理し、硬化工程へと移行する。多層電極の並びはプラスチックの連続ロール上に支持されるが、上記方法によって、電極領域及び接触パッド領域となる類似の金属露出領域が得られる。そして、試薬を、第2絶縁基板によって形成される電極領域に適用する。接着性スパーサー層（後述する）を、連続ロールラミネーションにより、第2絶縁基板（または絶縁性インク）に形成する。そして、上記の要領で、第2の電極ロールを製造し、活性電極領域及び試薬をさらす毛管空間を形成するため、第1のロールに重ねる。このように、材料の連続ロールに形成された多層センサは、その後、梱包の前にウェブから打ち抜くか、または型によって切断する。

上述のように、標準PCB基板（ガラス繊維基板に銅層を積層したもの）は、電気化学測定において障害があるため、電気化学センサーの作用電極として使用するのは不適切である。特に、メディエーターが作用電極の表面上で酸化される場合（電着法）には、銅もまた酸化されうるからであって、そのため電気化学的測定において障害がある。しかし、照合電極または対極の表面において還元が行われている場合（陰極法）には、銅は還元されず障害がないため、標準PCB基板を照合電極または対極に使用することができる。第1絶縁基板として標準PCB基板を使用した照合電極または対極の一実施例を説明する。

図3を参照しながら説明する。標準PCB基板には、ガラス繊維製基板31に積層された銅層30を含み、第1絶縁基板として使用される。導電性材料32（

ミシガン州ポートフロンズのAcheson Colloids社製の#DB2268 銀

／塩化銀インク)を、直接銅層30上にスクリーン印刷することができ、露出した切欠部33が除去される。最終的に、第1切欠部35及び第2切欠部33が形成されたスペーサ34(例えば、両面に接着剤を塗布したMYLAR(登録商標))が、導電性材料32の最上部に載置される。スペーサ34もまた、他の適当なプラスチックやガラス繊維によって形成することもできる。第1切欠部35及び第2切欠部33は、レーザ法(例えば、ウィスコンシン州、サマーセットのLaser Machining社による方法がある)を使用して切り欠くことも可能である。完成した照合電極または対極エレメント37において、第1切欠部35の領域は、下層の導電性材料32に露出し、照合電極または対極領域を形成する。第2切欠部33は下層の銅層30に露出し、照合電極または対極エレメント37とメータ及び電源との間の接触パッドとして機能する。さらに、ベントポート36が、スペーサ34、導電性材料32、銅層30及びガラス繊維基板31を貫通し、上記のように、毛管空間のためのベントポート及び／又は試料をこの毛管空間に導く手段として機能する。

本発明にかかる照合電極または対極エレメントの製造方法の他の実施例を図4に示す。第1導電性材料38(パラジウム等)の薄い基層または安定層を、薄い支持物質40上にスパッタリングまたは蒸着する。そして、第2導電性材料39(銀等)の薄い層がそれに続き、金属層で被覆された薄い支持物質41(例えば、カリフォルニア州、カナガパークのCourtaulds Performance Films社製造のもの)を形成する。上述のように、薄い支持材料40はポリイミド、またはポリエステル、PET、ポリカボネート等の他のポリマーによって形成することができる。金属層で被覆された支持物質41は、第1絶縁基板42に積層される。上述のように、この第1絶縁基板42はガラス繊維、ガラス、プラスチックによって形成することができる。別の方法として、第1導電性材料38を、薄い支持材料40上ではなく、第1絶縁基板42上に直接スパッタリング、または蒸着することも可能である。スペーサ43には、第1切欠部44及び第2切欠部45が含ま

まれ、このスペーサ43は金属被覆薄型支持基板41の最上部に載置される。スペーサ43には、上述のように、両面に接着剤が塗布されたMYLAR(登録商

標) 基板、または他の適当なプラスチックまたはガラス繊維を使用することができ。最後に、第2導電性材料39が銀の場合には、酸化工程によって塩化銀46の層が形成されているスペーサ43の第1切欠部44に塩化鉄( $\text{FeCl}_3$ )溶液(図示せず)を塗布する。照合電極領域を形成する工程もまた任意に、塩化鉄( $\text{FeCl}_3$ )による処理の前に金属被覆薄型支持基板41の表面にフォトリジスト層を適用し、パターニングすることにより支援される。また、別の方法として、金属被覆薄型支持基板41の選択された領域を塩化鉄( $\text{FeCl}_3$ )溶液に浸すことによって上記と同様の結果が得られる。完成した照合電極または対極エレメント48において、第1切欠部44の領域が層46に露出し、照合電極または対極エレメント領域を形成する。第2切欠部45は金属被覆薄型支持基板41に露出し、照合電極または対極エレメント48とメータ及び電源との間の接触パッドとして機能する。さらに、ベントポート47が形成され、このベントポート47は、スペーサ43、金属被覆薄型支持基板41及び第1絶縁基板42を貫通し、上記のように、完成した電気化学センサーに試料を導入するための手段として使用される。

#### 対向電極電気化学センサー

本発明にかかる対向電極電気化学センサーの一実施例を図5及び図6に示す。照合電極または対極エレメント48が、作用電極エレメント11からスペーサ43によって空間的に離間している。(スペーサ43は、通常、製造工程において照合電極または対極エレメント48に貼着されるが、図5に示す目的のために、エレメント48から分離して示す。) スペーサ43の第1切欠部44は、照合電極または対極エレメント48と電極エレメント11との間に位置する場合には、毛管空間49を形成する。作用電極エレメント11の第1切欠部8は、毛管空間49にさらされている金属被覆薄型支持基板3の作用電極領域を露出している。スペーサ43の第1切欠部44は、照合電極または対極エレメント48に貼着された場合には、層46を形成し(図5の仮想線によって示される)、層46はさらに毛管空間49に露出する。第2切欠部9及び45は、それぞれ金属被覆薄型

ータ及び電源との間の接触パッドとして機能する。

図 6 に示す電気化学センサー 5 2 において、毛管空間 4 9 ( 仮想線によって示される ) は、電気化学センサーの一つの縁に、第 1 の開口 5 0 を有する。さらに、作用電極エレメントのベントポート 1 0 及び / 又は照合電極若しくは対極エレメント 4 8 のベントポート 4 7 は、毛管空間 4 9 に第 2 の開口 5 1 を提供するの  
に使用することができる。ベントポートは、毛管空間に試料を導入する手段として任意に使用される。使用に際しては、検出または測定されるべき検体を含有する試料を、開口 5 0 またはベントポート 5 1 のいずれかを通して、電気化学センサー 5 2 の毛管空間 4 9 に導入する。いずれの場合でも、試料は、毛管現象により電気化学センサーの中に即座に入り込む。( 試料を毛管空間に入り込みやすくするため、毛管空間に界面活性剤を含ませることが好適である。 ) その結果、電気化学センサーが、測定者の介在なしに、自動的に測定される試料の体積を制御する。さらに、試料は全部毛管空間 4 9 内に存在するため、電気化学センサー 5 2 が挿入されるメータ及び患者の汚染を軽減あるいは除去することができ、試料が血液または生物流体である場合には顕著な効果がある。

#### 隣接電極電気化学センサーに使用する隣接電極エレメントの製造

本発明によって、隣接電極エレメントを製造することも可能であり、図 7 及び図 8 に示すように、隣接電極電気化学センサーが形成される。この工程は上述の対向電極エレメントの製造工程と類似のものである。しかし、電極は同じ支持基板上で互いに隣接するため、さらに金属エッチング工程が必要となる。導電性材料 6 1 ( 貴金属等 ) を薄い支持材料 6 2 ( 例えば、ポリイミド、またはポリエステル、PET、ポリカーボネート等の他のポリマー ) 上に真空スパッタリングまたは蒸着し、上述のように、金属被覆薄型支持材料 6 3 を形成する。( 図 7 a 乃至図 7 b。 ) この工程は、薄い基層の付着の前又は後に行うことができる。上記

工程を行う代わりに、上述のように、無電解メッキ法、または活性化と電気メッキの組み合わせによって、導電性材料 6 1 を薄い支持材料 6 2 の表面に付着させることも可能である。金属被覆薄型支持材料 6 3 を、適当な積層接着システム ( 例えば、カリフォルニア州、カナガパークの Courtaulds Performance Films 社の

2-FLEX (登録商標) 貼着システム等) によって、第1絶縁基板64 (例えば、10ミル (0.254 mm) 厚さのFR4裸ガラス繊維回路基板等) に積層する。(図7b。) 第1絶縁基板64には、上述のとおり、適当な非導電性ガラスやプラスチック材料を使用できる。この工程において、金属被覆薄型支持材料63及び第1絶縁基板64はホットプレスを使用して貼着することも可能である。

金属被覆薄型支持材料63の表面は、適当な溶媒系によって洗浄した後、光活性エッチレジスト65で被覆する。(図7c。) ポジ型またはネガ型のいずれのエッチレジストをも使用することができる。被覆方法は、半水溶性のレジストが使用されるかは液体レジストが使用されるかによって決定される。半水溶性のレジストは、一般的に、積層工程において適用される。一方、液体レジストは、漬け塗り、吹付塗り、流し塗り、スクリーン印刷される。特に、ネガ型のエッチレジストの場合には、デュボン社によって、「RESISTON」の商標名で販売されている半水溶性レジストスがホットロール積層工程において適用される。光活性エッチレジスト65、金属被覆薄型支持材料63及び第1絶縁基板64には、フォトマスク66を介して紫外線67が照射され、15分間180°Fで焼成される。(図7d。) その結果、光活性エッチレジスト65に潜像が形成され、紫外線67に曝された領域が現像液に不溶となる。現像液中での処理によって光活性エッチレジスト65の露光されなかった領域の下層の金属被覆薄型支持材料63にさらされていた部分が除去される。(図7e。)

そして、基板全体を、化学エッチング用腐食液 (例えば、導電性材料61が金の場合には王水またはKI及びI<sub>2</sub>溶液が使用できる) を含む浴槽の中に浸し、攪拌しながら制御した温度でインキュベートする。この化学エッチング用腐食液は、露出した金属被覆薄型支持材料63を溶解するが、光活性エッチレジスト65によって被覆された金属被覆薄型支持材料63の部分を溶解することはできない。(図7f。) そして、光活性エッチレジスト65を、金属被覆薄型支持材料63を所望の電極パターンに形成させた溶液とともに除去する。(図7g及び図

極領域 71 が含まれる。(図 8 a.) 最終的に、リード 70 は第 2 絶縁基板 68 によって絶縁され、第 2 絶縁基板 68 は、上述のように、対向する電極を形成するため、ソルダーレジストまたはスクリーン印刷可能な絶縁基板で構成することができる。(図 7 h 及び図 8 b.)

本発明では、銀を直接対極に電気メッキした後、 $\text{FeCl}_3$  で処理して表面の銀を塩化銀に変換することにより、対極を任意に照合電極に変換することが可能である。この工程を促進するため、電気防食用連結バスを組み入れるように設計することができ、これによって、多数の電極を一つの工程で電気メッキすることができる。メッキ工程がバッチ工程として行われるため、メッキ工程の間、金属の他の領域を保護する必要がある。この金属の他の領域の保護は、上述と同様の方法によって、隣接する作用電極/対極にエッチレジストを行うことによって解決される。別の方法としては、照合電極材料の一つの層(塩化銀インク等)を、金属層の最上部にスクリーン印刷して照合電極を製造する方法がある。

#### 試薬

検体(グルコース等)の濃度に対して選択的でかつ感度の高い信号を生じさせることが充分可能なセンサーを提供するための作用電極、照合電極、及び対極には、多くの異なる種類の試薬を適用することができる。これらの試薬は、上記のような電気化学センサーの作用電極の領域に、自動機械式ディスペンサー、スクリーン印刷、スロット塗布、ロール塗布、スピン塗布、ナイフ塗布、またはインクジェット印刷等を使用して塗布することができる。(場合によっては、作用電極及び対極の両方を試薬で被覆することもできる。)このように塗布された試薬は電極に薄膜を形成し、試料(血液等)を適用したときには、急速に膨潤し、そのときに、電極に対して適当な電位が印加され、電流が測定される。電流を測定することにより、目的の試料中の検体濃度が測定できる。高分子材料及びこの試

薬を含有した毛管空間を使用することにより、患者の指に巻かれている部分におけるセンサー中の化学薬品による汚染の危険性をかなり低減することができる。

血液試料全体の中のグルコースの測定に際し、作用電極エレメント及び照合電極エレメントを有する対向電極電気化学センサーを使用するように設計された場



合に、本発明において使用することのできる試薬の例を以下に示す。試薬の成分を表1に示す。

表1 試薬成分

成分	量
2-(N-モルフォリオ) スルホン酸エタン (MES緩衝剤)	100ミリモル (mM)
トリトン X-100	0.08重量%
ポリビニルアルコール (PVA) モル. 重量 10K、88%加水分解	1.00重量%
イミダゾールオスミウムメディエーター (還元型、合成については方法下記参照)	6.2ミリモル (mM)
グルコースオキシダーゼ	6000ユニット/ml

以下に、イミダゾールオスミウムメディエーターの還元型の合成方法について述べる。まず、オスミウムの中間体 ( $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ ) が最初に合成される。そして、イミダゾールオスミウムメディエーターの還元型 [ $\text{Os}(\text{II})(\text{bpy})_2(\text{im})\text{Cl}$ ] [ $\text{Cl}$ ] が合成される。 (「bpy」は、2-2' ビピリジンの短縮形であって、「im」はイミダゾールの短縮形である。)

#### オスミウムの中間体の合成

(1) 19.335gの $\text{K}_2\text{OsCl}_6$  (0.04019モル、Aldrich製)、及び13.295gのbpy (0.08512モル、Aldrich製)を計量し、1000mlの1首フラスコに移す。

(2) 400mlのN,N'-ジメチルホルムアミド (DMF、Mallinckrodt製)を前記フラスコに加え、すべての反応物を溶解する。

る。還流は、1時間低温に維持し（設定値を可変変圧器によって100%から65%に下げる）、過沸騰を避ける。

(4) 加熱を停止し、前記フラスコを連続攪拌しながら1時間乃至2時間かけて、30℃乃至40℃に冷却する。

(5) 上記混合物を、中間グレードのガラス溶融解フィルタ(150ml)を使用して真空濾過する。

(6) 前記フラスコを20mlのDMFで洗い流し、前記フィルターに注ぐ。

(7) 濾過されたDMF溶液を3リットルビーカーに移す。

(8) 22.799gの $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ （マリンクロット製）を計量し、別の2リットルビーカーに移す。

(9) 2リットルの脱イオン水を前記ビーカーに加えて $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を溶解する。

(10) 前記 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液を滴下漏斗に移し、前記攪拌したDMF溶液に、45分間にわたって滴下する（約5滴/秒）。

(11) 上記混合物を、氷浴槽において3時間以上冷却する。

(12) 冷却した混合物を、セラミックフィルタにワットマン質のフィルタ紙を使用して真空濾過する。

(13) 濾過物を50mlの水で2回、50mlのメタノールで2回、50mlのジエチルエーテルで2回、それぞれ洗浄する。

(14) 生成物、 $\text{Os}(\text{bpy})_3\text{Cl}$ を、50℃で、高真空度（約30インチ水銀柱）の下で15時間以上（一晚）乾燥する。

(15) 生成物を計量し、ネジキャップ付き褐色容器に移し、室温にてデシケー

タの中で保管する。生成量は理論値が23.35gであったが、実際には15.56g生成され、収率は66.6%であった。

#### イミダゾールオスミウムメディエーターの還元型の合成方法

(1) 14.01gの $\text{Os}(\text{bpy})_3\text{Cl}$ （0.0244モル）、及び2.30gのイミダゾール（0.0338モル、Aldrich製）を計量し、2000mlの1首フラスコに移す。

( 2 ) 6 0 0 m l のエタノールと 6 0 0 m l の脱イオン水を加え、上記混合物をすべて溶解する。

( 3 ) 前記フラスコの内容物を、攪拌しながら還流加熱する。還流は、6 時間低温に維持し ( 可変変圧器によって、設定値を 9 0 % から 6 0 % に下げる ) 、過沸騰を避ける。

( 4 ) 加熱を停止し、前記フラスコを 1 時間かけて 3 0 ℃乃至 4 0 ℃に連続攪拌しながら冷却する。

( 5 ) 前記溶液の半分を、1 0 0 0 m l の 1 首フラスコに移し、その溶液をロータリーエバポレーターで蒸発させる。溶液の残りを前記フラスコに加えロータリーエバポレーターで蒸発させる。

( 6 ) 乾燥生成物を、5 0 m l のエーテルでフラスコの壁面上で洗い流し、洗浄に使用したエーテルを廃棄する。

( 7 ) 生成物を、5 0 ℃で、高真空度 ( 約 3 0 インチ水銀柱 ) の下で 1 5 時間以上 ( 一晚 ) 乾燥する。

( 8 ) フラスコから付着物を掻き取り、生成物 ( [ O s ( I I ) ( b p y ) : ( i m ) C l ] [ C l ] ) を採取する。生成物を計量し、ネジキャップ付き褐色容器に移し、室温にてデシケータの中で保管する。生成量は理論値が 1 6 . 3 g であったが、実際には 1 6 . 1 g 生成され、収率は 9 8 . 8 % であった。

以下に、表 1 に示す試薬の準備方法、及び対向電極エレメントと組み合わせて使用して、電気化学センサーを形成する方法について説明する。

#### ( 1 ) ポリマーマトリックス

( a ) 1 . 9 5 2 g の M E S 緩衝剤を 8 5 m l のナノグレードの水に添加する。混合物が溶解するまで攪拌する。溶液の p H を、N a O H を使用して 5 . 5 に調節するとともに、溶液全体を 1 0 0 m l とする。

( b ) 0 . 0 8 g のトリトン X - 1 0 0 及び 1 g の P V A を、1 5 0 m l ビーカに添加する。緩衝剤溶液を添加して、溶液の全体重量を 1 0 0 g とする。混合物を加熱、沸騰させ、P V A を溶解する。

( a ) 4 . 0 m g の還元オースミウムメディエーター、 $[\text{Os}(\text{II})(\text{bpy})_2(\text{im})\text{Cl}][\text{Cl}]$  を 1 m l のポリマーマトリックスに添加する。混合物をかき混ぜ、メディエーターを溶解する。混合物に 6 0 0 0 ユニットのグルコースオキシダーゼを添加し、酵素が溶解するまで溶液を混合する。

本発明においては、上記試薬を使用することが好適であるが、他の種類の試薬、特に、流体試料中の検体と反応して、流体試料中の検体濃度と相関関係のある、電気化学的測定が可能な信号を発生させることのできる試薬を使用することもできる。試薬は少なくともメディエーター及び酵素を含有していなければならない。試料は、さらに、上記のように、緩衝剤、膜形成剤及び界面活性剤を含んでいることが好適である。

他のレドックスメディエーター系（例えば、レドックスメディエーターとして、上記イミダゾールオスミウムメディエーターではなく、フェリシアン化カリウムを使用した系）を利用することも可能であり、また、レドックスポリマー系（この系では、メディエーター及び酵素が電極表面上で固定される）を使用することも可能である。

#### 電気化学センサーの使用

上記電気化学センサーは、患者の指やその他の部位から芽刺装置によって採取された少量の血滴（ $3\mu\text{l}$  乃至  $20\mu\text{l}$ ）を使用して、血液中のグルコースレベルを決定するのに使用されるが、この用途に限定されるものではない。測定に要する試料が少量で良いことが発明の顕著な利点である。これによって、少量の試

料を採取するための非常に痛みの少ない芽刺装置を提供することができる。

対向電極電気化学センサーの製造及び使用例として、全血試料中のグルコース濃度の測定がある。以下、これについて説明する。照合電極エレメントが上記のようにして製造され、導電性材料として金を有するとともに、金の一部（毛管空間）を露出させるためスパーサが設けられる。銀／塩化銀ポリマー厚膜インク（Acheson Colloids製 DB 2 2 8 6）を 2 対 1 の重量割合でブトキシエタノールによって希釈する。これによって得られた  $2.5\mu\text{l}$  の混合物を毛管空間に移し、毛細領域の全体に広げる。そして、電極を  $90^\circ\text{C}$  で 1 5 分間乾燥する。

作用電極エレメントは上記の方法によって製造され、導電性材料として金を有する。1  $\mu$  l の被覆混合物（上記例示した試薬から得られる）を作用電極エレメントの電極表面に塗布する。被覆された電極は45℃で15分間乾燥される。

作用電極エレメントは、上記のように、また、図5及び図6に記載のように、照合電極エレメントとともにサンドイッチ状に形成され、電気化学センサーが完成する。以下に説明するように、完成した電気化学センサーは、グルコース分析に使用される。作用電極の電位は、銀/塩化銀照合電極に対して、ポテンショスタットによって、+200ミリボルト（mV）に調節される。10  $\mu$  l の添加糖を加えた静脈血を、第1の開口50を通して毛管空間49に添加する。そして、試料を電気化学センサーに添加してから10秒後に電流を測定する。図9は、グルコースが異なるレベルにある糖を加えた静脈血の検査により得られた用量作用曲線を示す。

本発明にかかる方法によって製造された電気化学センサーは、接触タブが電気的な接続をなし、測定回路を組み込んだ小型のメータに挿入して使用することが好適である。このメータには、通常、電流値の測定についてのアルゴリズムが組み込まれ、これによって、検体レベルが測定され、目視にて確認できるように表示される。電源及びメータの改良例としては、本願と同一出願人による米国特許4,963,814、「二股電源の調整」（パークスら、特許日1990年10月16日）、米国特許4,999,632、「ノイズ低減アナログデジタル変換」（パークスら、特許日1991年3月12日）、米国特許4,999,582、「電気化学センサー電極励起回路」（パークスら、特許日1991年3月12日）、米国特許5,243,516、「バイオセンシング装置及び方法」（ホワイト、特許日1993年9月7日）があり、これらの開示内容は本明細書において包含される。

本発明は、当業者が本発明にかかる装置を製造及び使用できる程度に、また、本発明を実施する際の最良の実施例を知ることができるように、さらに、他の発明及び従来技術と区別できるように、上記明細書及び図面に十分に明瞭かつ簡潔

が即座に考えられるが、これらは下記の特許請求の範囲に記載の発明の技術的範囲に含まれるものである。

【図1】

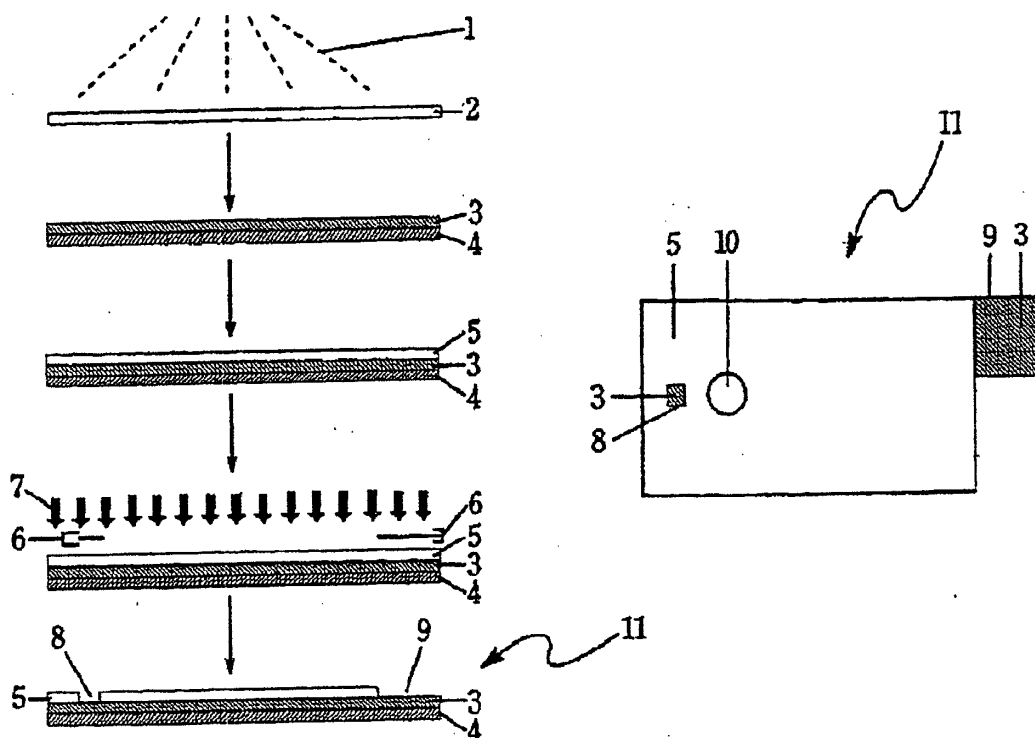
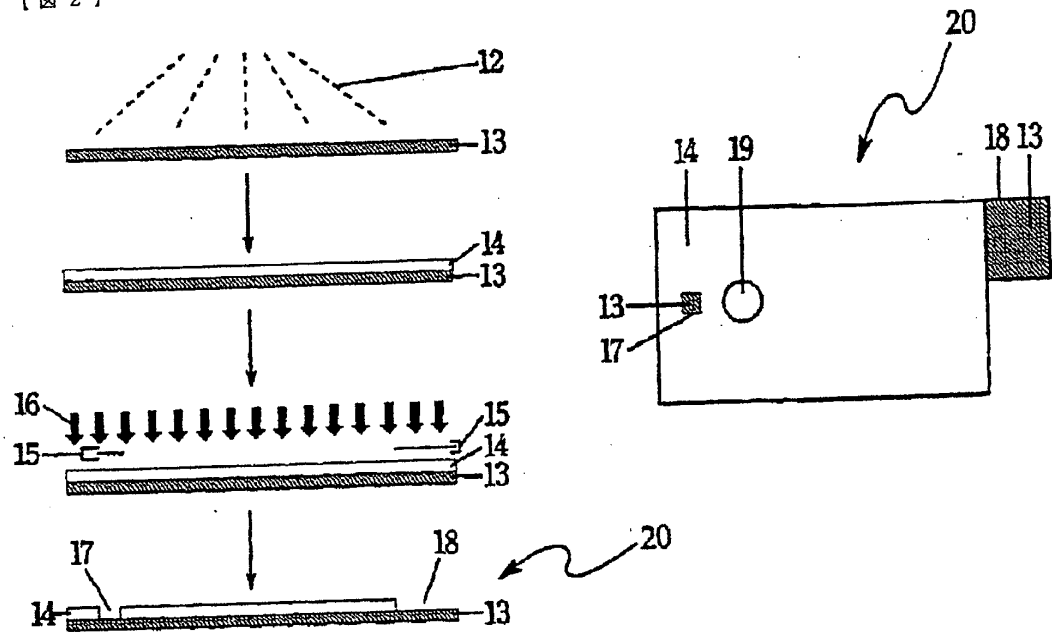
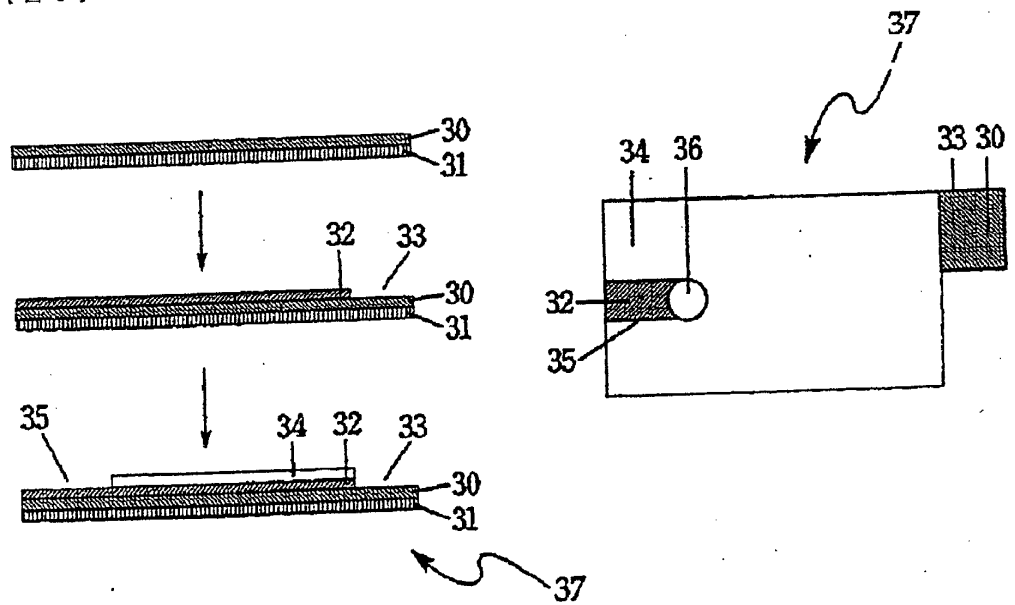


Fig. 1

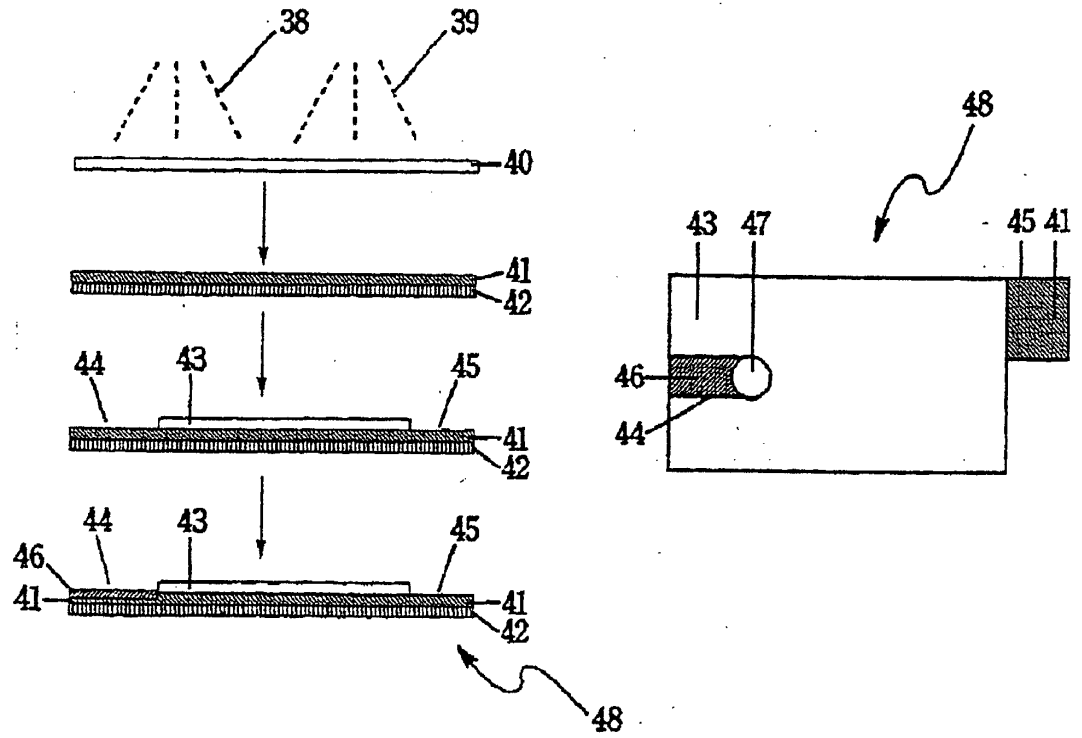
【 図 2 】

**Fig. 2**

【 図 3 】

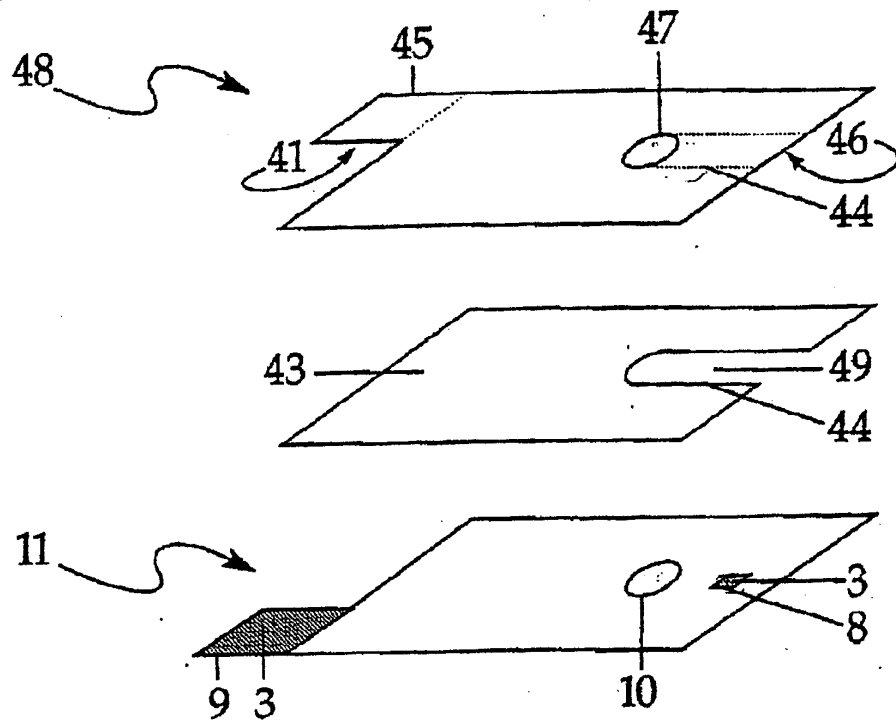
**Fig. 3**

【 图 4 】

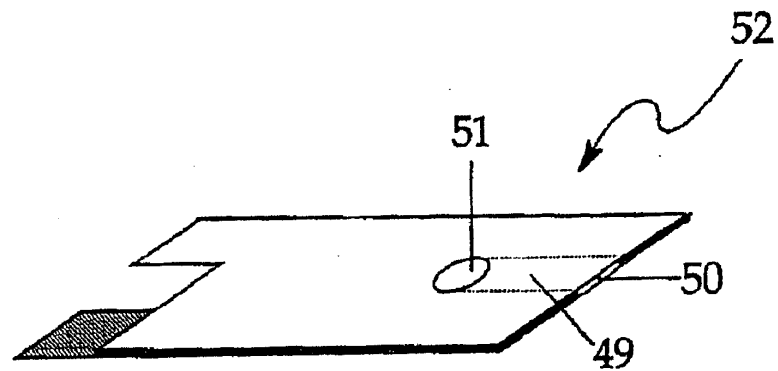
**Fig 4**



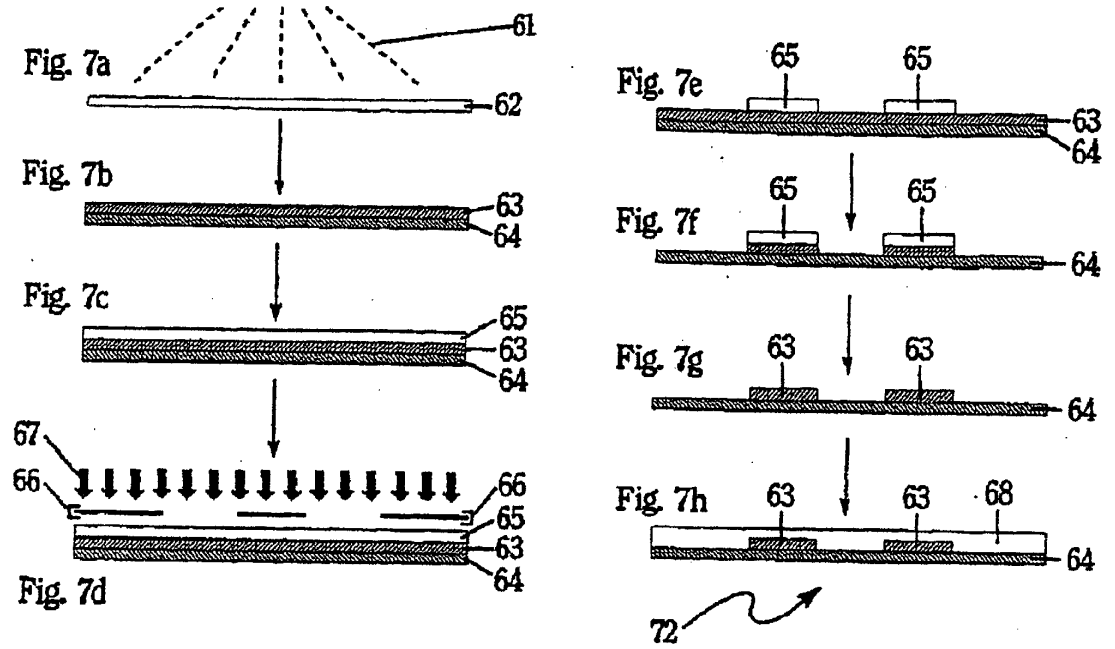
【 図 5 】

**Fig. 5**

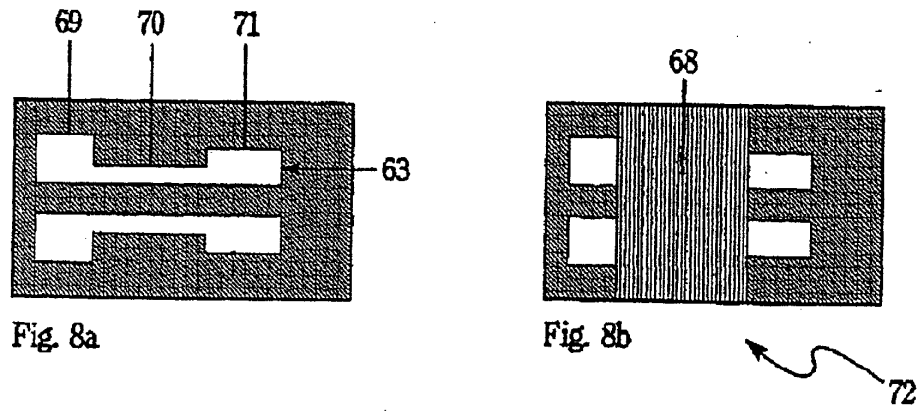
【 図 6 】

**Fig. 6**

【 图 7 】



【 图 8 】



【 図 9 】

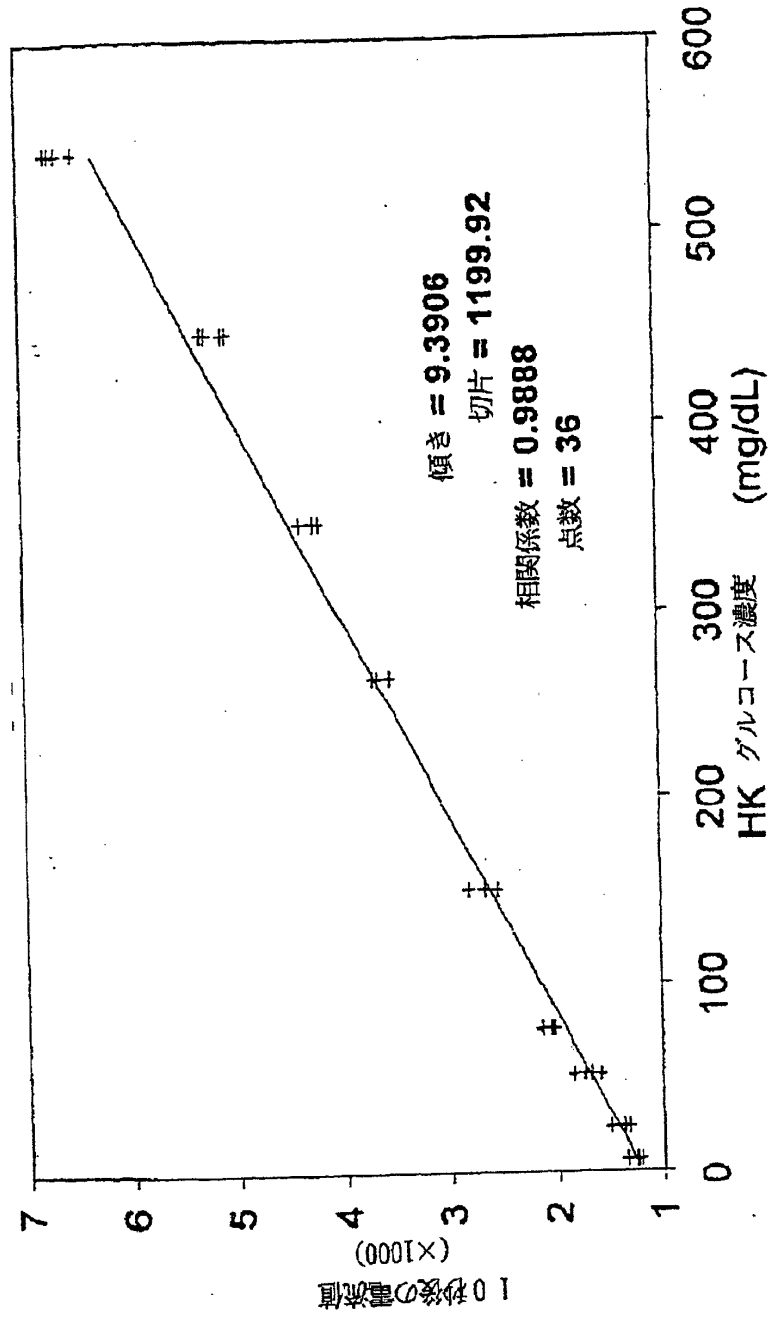


Fig. 9

【 国 際 調 査 報 告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/02157

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) :C12M 1/40; C25B 11/00

US CL :435/288; 427/125

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : Please See Extra Sheet.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US, A, 4,894,137 (TAKIZAWA ET AL.) 16 January 1990, see entire document.	23-26, 31, 32 ----- 27-30, 33-43, 56-62
X --- Y	US, A, 5,108,819 (HELLER ET AL.) 28 April 1992, see entire document.	31-34, 36, 37, 49-51 ----- 23-30, 35, 38- 43, 52-62

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* "T" later document published after the international filing date as priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention
* "E" earlier document published on or after the international filing date	* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	* "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 MAY 1995

Date of mailing of the international search report

07 JUN 1995

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

WILLIAM H. BEISNER

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/02157

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US, A, 5,288,636 (POLLMANN ET AL.) 22 February 1994, see entire document.	23-28, 49-52 — 29, 30, 36, 37, 42, 43, 53-62
X — Y	JP, A, 54-132,772 (MATSUSHITA ELEC. IND. KK) 16 October 1979, see entire document.	44, 49 — 45-48, 50-55
X — Y	US, A, 4,929,426 (BODAI ET AL.) 29 May 1990, see entire document.	44-48 — 49-55
A	DE, B, 2,122,608 (RICHLI ET AL.) 20 April 1978, see entire document.	1-62
A	JP, A, 63-300,954 (SHIMADZU SEISAKUSHO KK) 08 December 1988, see entire document.	1-62
A	JP, A, 62-32,351 (MORIIZUMI) 12 February 1987, see entire document.	1-62
A	US, A, 4,882,839 (OKADA) 28 November 1989, see entire document.	1-62

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/02157

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched

Classification System: U.S.

435/288, 291, 817; 422/82.01, 82.02; 204/153.1, 153.12, 403, 280, 290R, 291; 427/2.12, 2.13, 10, 58, 123-125, 508,  
510, 511, 551, 553, 558, 58, 96, 115

---

フロントページの続き

- (72)発明者 コーダル, リチャード ジェイ.  
アメリカ合衆国 46077 インディアナ州  
ジョンスヴィル, クラークストン ロー  
ド 11073番地
- (72)発明者 サリッジ, ニゲル エー.  
アメリカ合衆国 46240 インディアナ州  
インディアナポリス, 90ティーエイチ  
ストリート 1248 イー. 番地
- (72)発明者 ウィルセイ, クリストファー ディー.  
アメリカ合衆国 46032 インディアナ州  
カーメル, オーク ドライブ 516番地